

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

553576

(43) 国際公開日  
2004年10月28日 (28.10.2004)

PCT

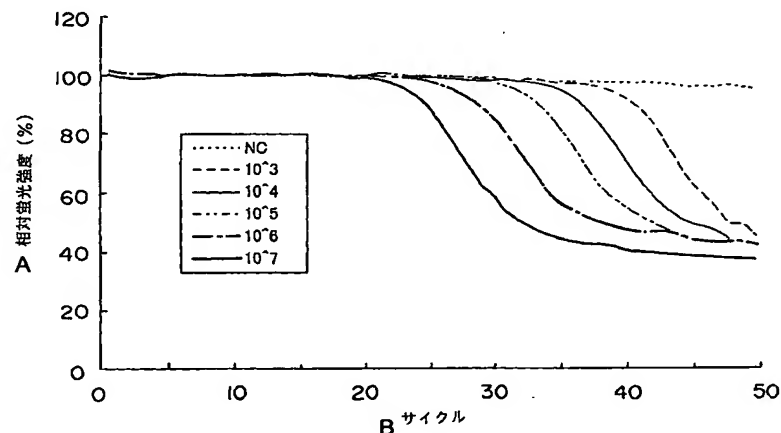
(10) 国際公開番号  
WO 2004/092415 A1

- (51) 国際特許分類: C12Q 1/68, C12N 15/09
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/005496
- (22) 国際出願日: 2004年4月16日 (16.04.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2003-111173 2003年4月16日 (16.04.2003) JP  
特願2003-114382 2003年4月18日 (18.04.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アークレイ株式会社 (ARKRAY, INC.) [JP/JP]; 〒6018045 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 平井 光春 (HIRAI, Mitsuharu) [JP/JP]; 〒6018045 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 アークレイ株式会社内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外 (KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 アクロポリス21ビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF DETECTING OR QUANTITATIVELY DETERMINING MITOCHONDRIAL DNA 3243 VARIATION, AND KIT THEREFOR

(54) 発明の名称: ミトコンドリアDNA3243変異の検出法および定量法ならびにそのためのキット

A...RELATIVE FLUORESCENCE INTENSITY (%)  
B...CYCLE

(57) Abstract: A method of detecting a DNA having mitochondrial DNA 3243 variation, in which use is made of quantitative determination PCR using a primer having a base sequence complementary for a base sequence of 12 to 30 base length starting from base No. 243 in the base sequence of SEQ ID No. 1. Further, there is provided a method of detecting a DNA having mitochondrial DNA 3243 variation, in which use is made of a nucleic acid probe having its end labeled with a fluorochrome which upon hybridization exhibits a drop of fluorescence of the fluorochrome, the nucleic acid probe having a base sequence complementary for a base sequence of 14 to 40 base length starting from base No. 230 in the base sequence of SEQ IN No. 2, the nucleic acid probe having its 3'-end labeled with a fluorochrome.

(57) 要約: 配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12~30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを用いる定量的PCRを用いる、ミトコンドリアDNA3243変異を有するDNAの検出方法、ならびに、末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーション

[続葉有]



NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

したときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号2に示す塩基配列において塩基番号230から始まる14~40塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有し、3'末端が蛍光色素で標識されている前記核酸プローブを用いる、ミトコンドリアDNA3243変異を有するDNAの検出方法。

## 明細書

ミトコンドリアDNA 3243変異の検出法および定量法ならびにそのためのキット

## 技術分野

本発明は、ミトコンドリアDNA 3243変異の検出法および定量法ならびにそのためのキットに関する。

## 背景技術

ミトコンドリアDNA 3243部位のA→G変異 (mt3243) は日本人糖尿病患者の1%に存在する変異で、単一遺伝子異常による糖尿病の中で、最も高頻度である。ミトコンドリア遺伝子異常の特徴の一つは正常と異常のミトコンドリアDNAが様々な割合で共存することであり、この状態をヘテロプラスミーと呼ぶ。mt3243変異のヘテロプラスミーの比率と病状の進行度には相関があるといわれており、病状の進行度や治療効果の測定に用いることが出来るのではないかと考えられる。

mt3243変異は変異が存在するとその部分に制限酵素の認識部位が出現するため、PCRで変異部分を含むように増幅を行い、制限酵素で切断し、その後電気泳動で切断されたかどうかを検出するという方法 (PCR-RFLP) で検出を行うことが出来る (例えば、臨床病理、1996年、第44巻、第8号、p. 778-782参照)。

PCRは数分子の鋳型から数10億倍もの分子を増幅するため、増幅産物がほんの少し混入した場合でも偽陽性、偽陰性の原因になり得る。PCR-RFLPはPCR反応後に増幅産物を取り出して制限酵素処理を行うという必要があるため、増幅産物が次の反応系に混入する恐れがある。よって、偽陽性、偽陰性の結果が得られてしまうことが考えられる。

さらに、PCR終了後、制限酵素で処理を行い、その後電気泳動を行うため、検出に必要な時間も非常に長くなってしまう。また、操作が複雑なため自動化が困難である。さらに、PCR時に変性およびアニーリングを繰り返すため、正常型

の配列と変異型の配列が間違っ結合してしまう。このような産物は制限酵素によって認識されないため切断されない（二本鎖の両方が変異型の場合のみ制限酵素が切断する）。よってヘテロプラスミーの割合を定量しようとしたときに、本来の値よりも変異型の割合が低下する。

一方、アレル特異的増幅法として、M A S A (mutant allele specific amplification) 法と呼ばれる方法が知られている（例えば、関谷剛男他編、「PCR法最前線—基礎技術から応用まで」、1997年、共立出版（株）、p. 140—142参照）。この方法では、一方のプライマーの3'末端が変異塩基になるように設定されたプライマー対を用いてPCRを行うことにより変異アレルが特異的に増幅される。

また、増幅産物の量に依存して蛍光が変化する系を用いて、蛍光の測定によりPCRにおける増幅産物の定量をリアルタイムに行い、その結果に基づいてサンプル中の核酸を定量する方法（リアルタイム定量的PCR）が知られている。この方法に従ってM A S A法を行い、M A S A法による増幅産物を定量できる。

一方、一般に、変異を含む領域をPCRで増幅した後、蛍光色素で標識された核酸プローブを用いて融解曲線分析を行い、融解曲線分析の結果に基づいて変異を解析する方法が知られている（クリニカルケミストリー(Clinical Chemistry), 2000年, 第46巻, 第5号, p. 631—635、特開2002—119291号公報）。

## 発明の開示

本発明の課題は、mt3243変異を検出および定量する方法ならびにそのためのキットを提供することである。また、本発明の課題は、mt3243変異を検出するのに有効な消光プローブを特定し、mt3243変異を検出する方法およびそのためのキットを提供することである。

本発明者らは、ミトコンドリアDNAにおいてmt3243変異を含む特定の領域に基づいてプライマー対を設計することにより、M A S A法によりmt3243変異を検出できることを見出した。

上述のプローブを用いる方法に関する文献においては、プローブの設計に関し、

末端部が蛍光色素により標識された消光プローブが標的核酸にハイブリダイゼーションしたとき、末端部分においてプローブ-核酸ハイブリッドの複数塩基対が少なくとも一つのGとCのペアを形成するように設計するという教示があるのみである。本発明者らは、mt3243変異に関し、上記条件を満たす消光プローブを設計し、検出を試みたが、容易に検出を可能とする消光プローブは得られなかった。

本発明者らは、mt3243変異を含む特定の領域に基づいて消光プローブを設計することにより、消光プローブを用いる融解曲線分析によりmt3243変異を検出できることを見出した。

本発明は、以上の知見に基づき完成されたものであり、以下のものを提供する。

(1) 試料から得られるDNAを鋳型として用いてPCRを行い、増幅産物を検出することを含む、ミトコンドリアDNA3243変異を有するDNAの検出方法であって、PCRで用いられるプライマーは、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12～30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含む検出方法。

(2) PCRで用いられるプライマーが、配列番号3に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号5に示す塩基配列を示すプライマーを含む(1)の方法。

(3) 試料から得られるDNAを鋳型として用いて定量的PCRを行い、増幅産物を定量することを含む、ミトコンドリアDNA3243変異を有するDNAの定量方法であって、定量的PCRは、増幅産物の量に依存して蛍光が変化する系を用いて、蛍光の測定によりPCRにおける増幅産物の定量をリアルタイムに行い、その結果に基づいてサンプル中のDNAを定量する方法であり、定量的PCRで用いられるプライマーは、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12～30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含む定量方法。

(4) 定量的PCRで用いられるプライマーが、配列番号3に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号5に示す塩基配列を示すプライマーからなる(3)の方法。

(5) (a) (3) 又は(4)に記載の方法により、ミトコンドリアDNA32

43変異を有するDNAを定量し、

(b) 試料から得られるDNAを鋳型として用いて定量的PCRを行い、増幅産物を定量することを含む、ミトコンドリアDNAの定量方法であって、定量的PCRは、増幅産物の量に依存して蛍光が変化する系を用いて、蛍光の測定によりPCRにおける増幅産物の定量をリアルタイムに行い、その結果に基づいてサンプル中のDNAを定量する方法により、ミトコンドリアDNAを定量し、

(c) (a) と (b) の結果から、ミトコンドリアDNA 3243変異のヘテロプラスミーの比率を算出する

ことを含む、試料に含まれるミトコンドリアDNA 3243変異のヘテロプラスミーの比率の測定方法。

(6) (b) の工程で用いられるプライマーが、配列番号3に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号4に示す塩基配列を示すプライマーからなる(5)の方法。

(7) 系が、5'末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号1に示す塩基配列において塩基番号212もしくは215から始まる15~40塩基長の塩基配列もしくは配列番号2に示す塩基配列において塩基番号222から始まる15~40塩基長の塩基配列を有する核酸プローブ、または、3'末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号2に示す塩基配列において塩基番号230から始まる14~40塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有する核酸プローブを含み、前記蛍光色素の蛍光が測定される(3)~(6)のいずれかの方法。

(8) (1)の方法のためのキットであって、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12~30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含む前記キット。

(9) 配列番号3に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号5に示す塩基配列を示すプライマーを含む(8)のキット。

(10) (3)の方法のためのキットであって、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12~30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有する

プライマーを含む前記キット。

(11) 配列番号3に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号5に示す塩基配列を示すプライマーを含む(10)のキット。

(12) (5)の方法のためのキットであって、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12~30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含む第1のプライマーペア、および、ミトコンドリアDNA定量用の第2のプライマーペアを含む前記キット。

(13) 第1のプライマーペアが、配列番号3に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号5に示す塩基配列を示すプライマーからなる(12)のキット。

(14) 第2のプライマーペアが、配列番号3に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号4に示す塩基配列を示すプライマーからなる(12)のキット。

(15) 5'末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号1に示す塩基配列において塩基番号212もしくは215から始まる15~40塩基長の塩基配列もしくは配列番号2に示す塩基配列において塩基番号222から始まる15~40塩基長の塩基配列を有する核酸プローブ、または、3'末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号2に示す塩基配列において塩基番号230から始まる14~40塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有する核酸プローブをさらに含む(10)~(14)のいずれかのキット。

(16) 末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号2に示す塩基配列において塩基番号230から始まる14~40塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有し、3'末端が蛍光色素で標識されている前記核酸プローブ。

(17) 核酸プローブが、配列番号21または22に示す塩基配列を有する(16)の核酸プローブ。

(18) 一塩基多型の部位を有する核酸について、蛍光色素で標識された核酸

プローブを用いて、蛍光色素の蛍光を測定することにより融解曲線分析を行い、融解曲線分析の結果に基づいて変異を検出する方法であって、一塩基多型は、ミトコンドリアDNAにおける3243位の変異であり、核酸プローブは、(16)または(17)の核酸プローブである前記方法。

(19) 試料に含まれる核酸における一塩基多型の部位を含む領域を増幅して一塩基多型を有する核酸を得ることを含む(18)の方法。

(20) 増幅をDNAポリメラーゼを用いる方法により行う(19)の方法。

(21) 増幅を核酸プローブの存在下で行う(20)の方法。

(22) 末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号2に示す塩基配列において塩基番号230から始まる14~40塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有し、3'末端が蛍光色素で標識されている前記核酸プローブを含む、(18)の方法のためのキット。

(23) 核酸プローブが、配列番号21または22に示す塩基配列を有する(22)のキット。

(24) ミトコンドリアDNAにおける3243位の変異を含む領域を、DNAポリメラーゼを用いる方法で増幅するためのプライマーをさらに含む(22)または(23)のキット。

本明細書において、相補的な塩基配列とは、対象の塩基配列の全長に対して相補的であることを意味する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、実施例1の方法(プライマーF-24及びR-19使用)による配列全体の定量の結果を示す。

図2は、実施例1の方法(プライマーF-24及びR-mt-16使用)による変異型配列の定量の結果を示す。

図3は、実施例1の方法(プライマーF-24及びR-mt-16使用)による変異遺伝子の割合の異なる試料における定量の結果を示す。

図4は、変異の識別不可能な消光プローブの位置を示す。



図5は、変異の識別可能な消光プローブの位置を示す。

図6は、実施例2の方法による変異遺伝子の割合の異なる試料における検出の結果を示す。図中、“wild”は野生型、“mutant”は変異型を示す。

発明を実施するための最良の形態

#### < 1 > 本発明第1検出方法

本発明第1検出方法は、試料から得られるDNAを鋳型として用いてPCRを行い、増幅産物を検出することを含む、ミトコンドリアDNA3243変異を有するDNAの検出方法であって、PCRで用いられるプライマーは、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12～30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含むことを特徴とする。

試料は、ミトコンドリアを含むものであれば特に限定されない。例としては、血液、口腔スワブ、組織等を挙げることができる。これらの試料から、ミトコンドリアDNAが調製される条件での通常の方法によりDNAを得ることができる。

本発明第1検出方法におけるPCRは、試料から得られるDNAを鋳型とし、特定のプライマーを使用する他は、通常の、PCRの方法に従って行うことができる。

本発明において用いられるプライマーは、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12～30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含む。すなわち、PCRで用いられるプライマーの一方が、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12～30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーである。

このプライマーの3'末端はmt3243変異の部位であり、従って、このプライマーがアニールした場合のみ、DNAポリメラーゼによる伸長反応が起こるため、変異型の配列を有するDNAが特異的に増幅される。従って、増幅産物の検出によりmt3243変異を有するDNAが検出されることになる。

PCRに用いるプライマーは、PCRが可能な領域内に設定され、かつ、上記のように3'末端がmt3243変異の部位になるようにされたプライマーを含む他は、通常のPCRにおけるプライマーペアの設定方法と同様にして設定することができる。

る。プライマーの長さ及び $T_m$ は、通常には、12mer～40merで40～70℃、好ましくは16mer～30merで55～60℃である。プライマーペアの各プライマーの長さは同一でなくてもよいが、両プライマーの $T_m$ はほぼ同一であること（通常には、相違が2℃以内）が好ましい。なお、 $T_m$ 値は最近接塩基対法(Nearest Neighbor)により算出した値である。プライマーペアの例としては、配列番号3及び5に示す塩基配列を有するプライマーからなるものが挙げられる。

上記の特定の領域におけるプライマーペアの設定は、PCRの条件を考慮して当業者に公知の方法に従って行えばよい。プライマーペアの設定は、プライマー設定用のコンピュータープログラムに基づいて行うことができる。

PCRの条件は、通常の、PCRの方法に従って設定すればよい。本発明第1検出方法における代表的なPCR反応液の組成を挙げれば、以下の通りである。

表 1

DNA断片	$10^1 \sim 10^8$ 分子/反応
プライマー	200～1000 nM
ヌクレオチド	各20～200 $\mu$ M
DNAポリメラーゼ	0.01～0.03 単位/ $\mu$ l
Tris-HCl (pH 8.4～9.0)	5～20mM
MgCl <sub>2</sub>	1.5～3mM
KCl	10～100mM
グリセロール	0～20%

(最終液量: 10～100  $\mu$ l)

また、本発明第1検出方法における代表的な温度サイクルを挙げれば、以下の通りであり、この温度サイクルを通常25～40回繰り返す。

- (1) 変性、90～98℃、1～60秒
- (2) アニール、60～70℃、10～60秒
- (3) 伸長、60～75℃、10～180秒

アニール及び伸長を一ステップで行う場合には、60～70℃、10～180秒の条件が挙げられる。

本発明第1検出方法における増幅産物の検出は、通常の、増幅産物の検出方法

に従って行うことができる。例えば、増幅産物をアガロースゲル電気泳動に付して検出してもよいし、増幅産物に結合して蛍光が変化する物質（例えば、二本鎖DNAに結合し、結合により蛍光強度が変化する蛍光色素等）の存在下で蛍光を測定してもよい。

## < 2 > 本発明定量方法

本発明定量方法は、試料から得られるDNAを鋳型として用いて定量的PCRを行い、増幅産物を定量することを含む、ミトコンドリアDNA3243変異を有するDNAの定量方法であって、定量的PCRは、増幅産物の量に依存して蛍光が変化する系を用いて、蛍光の測定によりPCRにおける増幅産物の量をリアルタイムに行い、その結果に基づいてサンプル中のDNAを定量する方法であり、定量的PCRで用いられるプライマーは、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12～30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含むことを特徴とする。

試料からのDNAの調製およびプライマーは、本発明検出方法に関し説明した通りである。

増幅産物の量に依存して蛍光が変化する系を用いて、蛍光の測定によりPCRにおける増幅産物の量をリアルタイムに行い、その結果に基づいてサンプル中のDNAを定量する定量的PCRは、公知の方法に従って行うことができる。このような方法の例としては、増幅産物にハイブリダイゼーションする、蛍光標識したプローブを用いる方法、二本鎖DNAに特異的に結合する試薬を用いる方法等が挙げられる。

蛍光標識したプローブの例としては、5'末端に蛍光色素が、3'末端にその蛍光色素の発するエネルギーを吸収する消光物質が結合したプローブ（例えばTa qMan(商標)プローブ）、末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブ（例えば、特開2002-119291号公報参照）等が挙げられる。

以下、末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブ（消光プローブ）を例にして、本発明において

使用できるプローブについて説明する。この態様では、消光プローブが標的核酸にハイブリダイゼーションしたとき、末端部分においてプローブ-核酸ハイブリッドの複数塩基対が少なくとも一つのGとCのペアを形成するように設計する。このように設計されたプローブの例としては、5'末端が蛍光色素で標識されたものでは、配列番号1に示す塩基配列において塩基番号212もしくは215から始まる15～40塩基長の塩基配列または配列番号2に示す塩基配列において塩基番号222から始まる15～40塩基長の塩基配列を有するものが挙げられる。また、3'末端が蛍光色素で標識されたものでは、配列番号2に示す塩基配列において塩基番号230から始まる14～40塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するものが挙げられる。

本発明における消光プローブは、上記のような塩基配列を有する他は、特開2002-119291号公報に記載された消光プローブと同様でよい。本発明の使用される消光プローブの塩基配列の例としては、配列番号6～10に示すものが挙げられる。蛍光色素としては、特開2002-119291号公報に記載されたものを使用できるが、具体例としては、FAM(商標)、TAMRA(商標)、BODIPY(商標)FL等が挙げられる。蛍光色素のオリゴヌクレオチドへの結合方法は、通常の方法、例えば特開2002-119291号公報に記載の方法に従って行うことができる。

本発明定量方法は、特定のプライマーペアを用いてミトコンドリアDNAのmt3243変異を含む領域を増幅することの他は、蛍光色素の蛍光を測定することによるリアルタイムPCR法に従って行うことができる。本発明定量方法においては、上記プローブの存在下で増幅を行うが、用いるプローブに応じて、増幅の反応条件等を調整することは当業者であれば容易である。

本発明定量方法における代表的なPCR反応液の組成を挙げれば、以下の通りである。

表 2

DNA断片	$10^1 \sim 10^8$ 分子/反応
プライマー	200~1000 nM
プローブ	100~1000 nM
ヌクレオチド	各20~200 $\mu$ M
DNAポリメラーゼ	0.01~0.03単位/ $\mu$ l
Tris-HCl (pH 8.4~9.0)	5~20mM
MgCl <sub>2</sub>	1.5~3mM
KCl	10~100mM
グリセロール	0~20%
(最終液量: 10~100 $\mu$ l)	

また、代表的な温度サイクルを挙げれば、以下の通りであり、この温度サイクルを通常25~40回繰り返す。

- (1) 変性、90~98°C、1~60秒
- (2) アニール、60~70°C、10~60秒
- (3) 伸長、60~75°C、10~180秒

アニール及び伸長を一ステップで行う場合には、60~70°C、10~180秒の条件が挙げられる。

本発明定量方法においては、PCRを行いながら検出も行うため、反応終了後増幅産物を取り扱う必要がない。よって、増幅産物による汚染の心配がない。また、PCRを行いながら検出も行うため、検出に必要な時間も大幅に短縮出来る。さらに、増幅に必要な機器と同じ機器で検出するため、容器を移動する必要がない。よって、自動化も容易である。さらに、制限酵素を使用しないため定量性にも優れている。

この方法は感度も良く、ヘテロプラスミーの比率が1%以下でも検出可能である。従って、上記定量方法により、mt3243変異を有するDNAを定量し、また、全ミトコンドリアDNAを定量し、それらの定量結果からmt3243変異のヘテロプラスミーの比率を算出することができる。すなわち、本発明は、mt3243変異のヘテロプラスミーの比率の測定方法を提供する。本発明測定方法は、(a) 本発明定量方法により、ミトコンドリアDNA3243変異を有するDNAを定量し、(b) 試料

から得られるDNAを鋳型として用いて定量的PCRを行い、増幅産物を定量することを含む、ミトコンドリアDNAの定量方法であって、定量的PCRは、増幅産物の量に依存して蛍光が変化する系を用いて、蛍光の測定によりPCRにおける増幅産物の定量をリアルタイムに行い、その結果に基づいてサンプル中のDNAを定量する方法により、ミトコンドリアDNAを定量し、(c) (a) と (b) の結果から、ミトコンドリアDNA 3243 変異のヘテロプラスミーの比率を算出することを含むを特徴とする。

(b) の工程は、プライマーを、mt3243変異にかかわらずミトコンドリアDNAを増幅できるように設定する他は(a) の工程と同様にして行うことができる。

(b) の工程におけるPCRに用いるプライマーペアは、通常のPCRにおけるプライマーペアの設定方法と同様にして設定することができる。プライマーの長さ及び $T_m$ は、通常には、12mer~40merで40~70℃、好ましくは16mer~30merで55~60℃である。プライマーペアの各プライマーの長さは同一でなくてもよいが、両プライマーの $T_m$ はほぼ同一であること（通常には、相違が2℃以内）が好ましい。なお、 $T_m$ 値は最近接塩基対法(Nearest Neighbor)により算出した値である。(b) の工程で使用されるプライマーペアは、(a) の工程で使用されるプライマーペアと大部分で重複していることが好ましい。このようにすることによって、プライマーペアの相違の増幅効率に対する影響が少なくなり、正確なヘテロプラスミーの比率を求めることができる。プライマーペアの例としては、配列番号3及び4に示す塩基配列を有するプライマーからなるものが挙げられる。

(a) の工程では、変異型ミトコンドリアDNAの定量値、(b) の工程では、全ミトコンドリアDNAの定量値が得られるので、(a) の定量値を(b) の定量値で除算することによりヘテロプラスミーの比率が算出される。(a) 及び (b) の工程の定量結果は(c) の工程で使用されるので、(a) 及び(b) の工程は同時に行ってもよいし、いずれを先に行ってもよい。

### < 3 > 本発明検出キット

本発明検出キットは、本発明第1 検出方法に用いるためのキットである。このキットは、配列番号1 に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12~30塩基長の

塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含むことを特徴とする。

プライマーについては、本発明検出方法に関し、上記に説明した通りである。

本発明検出キットにおいてプライマーは、混合物とされていてもよいし、別個に収容されていてもよい。

本発明検出キットは、プライマーの他に、PCRおよび／または増幅産物の検出を行うのに必要とされる試薬類をさらに含んでいてもよい。

#### < 4 > 本発明定量キット

本発明定量キットは、本発明定量方法に用いるためのキットである。このキットは、配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12～30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含むことを特徴とする。

本発明定量キットは、5'末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブ（消光プローブ）であって、配列番号 1 に示す塩基配列において塩基番号212もしくは215から始まる15～40塩基長の塩基配列または配列番号 2 に示す塩基配列において塩基番号222から始まる15～40塩基長の塩基配列を有する核酸プローブを含むことが好ましい。

プライマーおよび消光プローブについては、本発明の定量方法に関し、上記に説明した通りである。

本発明定量キットは、消光プローブの他に、本発明の定量方法におけるPCRを行うのに必要とされる試薬類をさらに含んでいてもよい。本発明の定量キットを、ヘテロプラスミーの比率の測定に用いる場合には、本発明定量キットは、(b)の工程で使用されるプライマーペアは、(a)の工程で使用されるプライマーペアと大部分で重複していることが好ましい。

本発明定量キットにおいて消光プローブ、プライマー及びその他の試薬類は、別個に収容されていてもよいし、それらの一部が混合物とされていてもよい。

#### < 5 > 本発明プローブおよび本発明第 2 検出方法

本発明プローブは、末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号 2 に示す塩基

配列において塩基番号230から始まる14～40塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有し、3'末端が蛍光色素で標識されていることを特徴とする。

本発明プローブは、配列番号2に示す塩基配列 (mt3243変異における変異型の塩基を有する配列) において塩基番号230から始まる14～40塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有する他は、特開2002-119291に記載された消光プローブと同様でよい。本発明に使用される消光プローブの塩基配列の例としては、配列番号21または22に示すものが挙げられる。蛍光色素としては、特開2002-119291に記載されたものが使用できるが、具体例としては、FAM(商標)、TAMRA(商標)、BODIPY(商標) FL等が挙げられる。蛍光色素のオリゴヌクレオチドへの結合方法は、通常の方法、例えば特開2002-119291に記載の方法に従って行うことができる。

本発明第2検出方法は、一塩基多型 (mt3243) の部位を有する核酸について、蛍光色素で標識された核酸プローブを用いて、蛍光色素の蛍光を測定することにより融解曲線分析を行い、融解曲線分析の結果に基づいて変異を検出する方法であって、一塩基多型は、mt3243変異であり、核酸プローブは本発明プローブであることを特徴とする。

本発明第2検出方法は、mt3243変異を含む領域を増幅すること、および、本発明プローブを用いることの他は、通常の核酸増幅および融解曲線分析 (T<sub>m</sub>解析) の方法に従って行うことができる。

核酸増幅の方法としては、ポリメラーゼを用いる方法が好ましく、その例としては、PCR、ICAN、LAMP等が挙げられる。ポリメラーゼを用いる方法により増幅する場合は、本発明プローブの存在下で増幅を行うことが好ましい。用いるプローブに応じて、増幅の反応条件等を調整することは当業者であれば容易である。これにより、核酸の増幅後にプローブのT<sub>m</sub>を解析するだけなので、反応終了後増幅産物を取り扱う必要がない。よって、増幅産物による汚染の心配がない。また、増幅に必要な機器と同じ機器で検出することが可能なので、容器を移動する必要すらない。よって、自動化も容易である。

以下、PCRを用いる場合を例として、さらに説明する。PCRに用いるプライマー対は、本発明プローブがハイブリダイゼーションできる領域が増幅されるように



する他は、通常のPCRにおけるプライマー対の設定方法と同様にして設定することができる。プライマーの長さおよび $T_m$ は、通常には、12mer～40merで40～70℃、好ましくは16mer～30merで55～60℃である。プライマー対の各プライマーの長さは同一でなくてもよいが、両プライマーの $T_m$ はほぼ同一（通常には、相違が2℃以内）であることが好ましい。なお、 $T_m$ 値は最近接塩基対(Nearest Neighbor)法により算出した値である。プライマー対の例としては、配列番号2および3に示す塩基配列を有するプライマーからなるものが挙げられる。

PCRは、本発明プローブの存在下で行うことが好ましい。これにより、増幅反応終了後に増幅産物を取り扱う操作を行うことなく $T_m$ 解析を行うことができる。用いるプローブに応じて、プライマーの $T_m$ やPCRの反応条件を調整することは当業者であれば容易である。

代表的なPCR反応液の組成を挙げれば、以下の通りである。

表 3

DNA断片	$10^1 \sim 10^8$ 分子/反応
プライマー	200～1000 nM
プローブ	100～1000 nM
ヌクレオチド	各20～200 $\mu$ M
DNAポリメラーゼ	0.01～0.03 単位/ $\mu$ l
Tris-HCl (pH 8.4～9.0)	5～20mM
MgCl <sub>2</sub>	1.5～3mM
KCl	10～100mM
グリセロール	0～20%

(最終液量: 10～100  $\mu$ l)

また、代表的な温度サイクルを挙げれば、以下の通りであり、この温度サイクルを通常25～40回繰り返す。

- (1) 変性、90～98℃、1～60秒
- (2) アニール、60～70℃、10～60秒
- (3) 伸長、60～75℃、10～180秒

アニールおよび伸長を一ステップで行う場合には、60～70℃、10～180秒

の条件が挙げられる。

T<sub>m</sub>解析は、本発明プローブの蛍光色素の蛍光を測定する他は通常の方法に従って行うことができる。蛍光の測定は、蛍光色素に応じた波長の励起光を用い発光波長の光を測定することに行うことができる。T<sub>m</sub>解析における昇温速度は、通常には、0.1～1℃/秒である。T<sub>m</sub>解析を行うときの反応液の組成は、プローブとその塩基配列に相補的な配列を有する核酸とのハイブリダイゼーションが可能であれば特に制限されないが、通常には、一価の陽イオン濃度が1.5～5 mM、pHが7～9である。PCR等のDNAポリメラーゼを用いる増幅方法の反応液は、通常、この条件を満たすので、増幅後の反応液をそのままT<sub>m</sub>解析に用いることができる。

T<sub>m</sub>解析の結果に基づくmt3243変異の検出は通常の方法に従って行うことができる。本発明第2検出方法における検出とは、変異の有無の検出の他、変異型DNAの定量、野生型DNAと変異型DNAの割合の測定も包含する。

#### < 6 > 本発明キット

本発明キットは、本発明第2検出方法に用いるためのキットである。このキットは、末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブ（消光プローブ）であって、配列番号2に示す塩基配列において塩基番号230から始まる14～40塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有し、3'末端が蛍光色素で標識されている核酸プローブを含むことを特徴とする。

消光プローブについては、本発明プローブに関し、上記に説明した通りである。

本発明キットは、消光プローブの他に、本発明第2検出方法における核酸増幅を行うのに必要とされる試薬類、特にDNAポリメラーゼを用いる増幅のためのプライマーをさらに含んでもよい。

本発明キットにおいて消光プローブ、プライマーおよびその他の試薬類は、別個に収容されていてもよいし、それらの一部が混合物とされていてもよい。

#### 実施例

以下に、本発明を実施例により具体的に説明する。

## 実施例 1

ヒトミトコンドリア3243A→G変異 (mt3243変異) の部位を含む塩基配列 (配列番号 2、塩基番号243がミトコンドリア遺伝子3243位に相当) に基づき、mt3243変異を含む部分を増幅できるように表 4 に示すプライマーを設計した。表 4 中、位置は、配列番号 2 に示す塩基配列における塩基番号を示す。

表 4

## プライマー

名称	配列 (5' → 3')	mer	位置	配列番号
F-24	ctcaacttagtattataccacac	24	187-210	3
R-19	ttttatgcgattaccgggc	19	262-244	4
R-mt-16	atgcgattaccgggcc	16	258-243	5

次に、表 5 に示す、末端部にCを有するプローブを設計した。表 5 中、位置は、配列番号 1 または 2 に示す塩基配列における塩基番号を示す。また、塩基配列中の大文字は、mt3243変異の部位を示し、3' 末端の (P) は、リン酸化されていることを示す。BODIPY (商標) FL による標識は、常法に従って行った。

表 5

## プローブ

名称	配列 (5' → 3')	mer	位置
5FL-mut-5-23	(BODIPY FL)-cagggtttgttaagatggcagGg-(P) (配列番号 6)	23	222-244
5FL-1-24	(BODIPY FL)-ccaagaacagggtttgttaagatg-(P) (配列番号 7)	24	215-238
5FL-1-26	(BODIPY FL)-ccaagaacagggtttgttaagatggc-(P) (配列番号 8)	26	215-240
5FL-1-28	(BODIPY FL)-ccaagaacagggtttgttaagatggcag-(P) (配列番号 9)	28	215-242
5FL-3-30	(BODIPY FL)-cacccaagaacagggtttgttaagatggca-(P) (配列番号 10)	30	212-241

mt3243変異周辺領域を組み込んだプラスミドをサンプルとし、iCycler (Bio-Rad)を用いて、以下の条件でリアルタイムPCRを行った。リアルタイム解析における励起波長及び検出波長は、それぞれ490nm及び530nmであった。

表 6

## 反応液組成

## 1. 正常型配列及び変異型配列の両方の定量の系 (全ミトコンドリア数定量の系)

H <sub>2</sub> O	17.575 $\mu$ L
10×Gene Taqバッファー	2.5 $\mu$ L
40% グリセロール	1.875 $\mu$ L
10mM 各dATP, dUTP, dGTP, dCTP	0.5 $\mu$ L
2U/ $\mu$ L ウラシル-N-グリコシラーゼ	0.05 $\mu$ L
5 $\mu$ M プローブ	1 $\mu$ L
100 $\mu$ M プライマーF-24	0.125 $\mu$ L
100 $\mu$ M プライマーR-19	0.25 $\mu$ L
5U/ $\mu$ L Gene Taq	0.125 $\mu$ L
サンプル	1 $\mu$ L
合計	25 $\mu$ L

## 2. 変異型配列定量の系 (変異を有するミトコンドリアの数の定量の系)

H <sub>2</sub> O	18.825 $\mu$ L
10×Gene Taqバッファー	2.5 $\mu$ L
40% グリセロール	0.625 $\mu$ L
10mM 各dATP, dUTP, dGTP, dCTP	0.5 $\mu$ L
2U/ $\mu$ L ウラシル-N-グリコシラーゼ	0.05 $\mu$ L
5 $\mu$ M プローブ	1 $\mu$ L
100 $\mu$ M プライマーF-24	0.125 $\mu$ L
100 $\mu$ M プライマーR-mt-16	0.25 $\mu$ L
5U/ $\mu$ L Gene Taq	0.125 $\mu$ L
サンプル	1 $\mu$ L
合計	25 $\mu$ L

表 7

反応条件

50°C, 2min

↓

95°C, 2min

↓

95°C, 10sec

56°C, 30sec (50サイクル)

サンプルとして、種々のコピー数で、正常型配列を有するプラスミドを含むサンプルを調製し、プローブとして、プローブ5FL-3-30を用いて、上記1の系で定量を行った。結果を図1に示す。図から明らかなように、定量が可能なが確認された。

サンプルとして、種々のコピー数で、変異型配列を有するプラスミドを含むサンプルを調製し、プローブとして、プローブ5FL-3-30を用いて、上記2の系で定量を行った。結果を図2に示す。図から明らかなように、定量が可能なが確認された。

サンプルとして、種々の比率で、変異型配列を有するプラスミドと正常型配列を有するプラスミドを含むサンプルとの混合物を調製し、プローブとして、プローブ5FL-3-30を用いて、上記2の系で定量を行った。結果を図3に示す。同じサンプルを上記1の系で定量し、変異型配列の比率を算出すると、サンプルの調製時の比率と一致した結果が得られた。

プローブとして、プローブ5FL-1-24、5FL-1-26、5FL-1-28及び5FL-mut-5-23を用いた場合も同様の結果が得られた。

なお、図1～3において、縦軸は、反応開始時を100%としたときの蛍光強度、横軸はPCRのサイクル数である。

## 実施例 2

ヒトミトコンドリア3243A→G変異 (mt3243変異) の部位を含む塩基配列 (配列番号2、塩基番号243がミトコンドリア遺伝子3243位に相当) に基づき、mt324

3変異を含む部分を増幅できるように表8に示すプライマーを設計した。表8中、位置は、配列番号1に示す塩基配列における塩基番号を示す。

表8

## プライマー

名称	配列(5'→3')	mer	位置	配列番号
F-27	catctcaacttagtattataccacac	27	184-210	11
R-22	agaggaattgaacctctgactg	22	296-275	12

次に、表9に示す、末端部にCを有するプローブを設計した。表9中、位置は、配列番号1に示す塩基配列における塩基番号を示す。また、塩基配列中の大文字は、mt3243変異の部位を示し、3'末端の(P)は、リン酸化されていることを示す。BODIPY(商標) FL又はTAMRA(商標)による標識は、常法に従って行った。

表9

## プローブ

名称	配列(5'→3')	mer	位置	配列番号
3FL-mt-F3-20	tttgттаagatggcagGgcc-(BODIPY FL)	20	227-246	13
3T-mt-F2-21	tttgттаagatggcagGgccc-(TAMRA)	21	227-247	14
3T-mt-R1-22	gcgattaccgggcCctgccatc-(TAMRA)	22	256-235	15
5T-mt-R2-20	(TAMRA)-ccgggcCctgccatcttaac-(P)	20	249-230	16
3T-mt-F2-17	ttaagatggcagGgccc-(TAMRA)	17	231-247	17
3T-mt-F3-16	ttaagatggcagGgcc-(TAMRA)	16	231-246	18
3T-mt-R1-20	gattaccgggcCctgccatc-(TAMRA)	20	254-235	19
3T-mt-F1-16	gcagGgcccggtaatc-(TAMRA)	16	239-254	20
3T-mt-R2-18	gggcCctgccatcttaac-(TAMRA)	18	247-230	21
3T-mt-R2-17	ggcCctgccatcttaac-(TAMRA)	17	246-230	22
3FL-mt-R2-18	gggcCctgccatcttaac-(BODIPY FL)	18	247-230	21
3FL-mt-R2-17	ggcCctgccatcttaac-(BODIPY FL)	17	246-230	22

mt3243変異周辺領域を組み込んだプラスミドをサンプルとして、Smart Cycler System (Cepheid)を用い、以下の条件でPCRおよびTm解析を行った。Tm解析における励起波長および検出波長は、それぞれ450~495 nmおよび505~537 nm (BODI

PY FL)、527～555 nmおよび565～605 nm (TAMRA) であった。

表 1 0

反応液組成	
H <sub>2</sub> O	15.995 $\mu$ L
10×Gene Taqバッファー	2.5 $\mu$ L
40% グリセロール	3.125 $\mu$ L
各10mM dATP, dUTP, dGTP, dCTP	0.5 $\mu$ L
2U/ $\mu$ L ウラシル-N-グリコシラーゼ	0.05 $\mu$ L
5 $\mu$ M プローブ	1 $\mu$ L
100mM MgCl <sub>2</sub>	0.375 $\mu$ L
100 $\mu$ M プライマーF-27	0.25 $\mu$ L
100 $\mu$ M プライマーR-22	0.125 $\mu$ L
5U/ $\mu$ L Gene Taq FP	0.125 $\mu$ L
サンプル (0～2000コピー)	1 $\mu$ L
合計	25 $\mu$ L

表 1 1

反応条件	
50°C, 2min	
↓	
95°C, 2min	
↓	
95°C, 1sec	
66°C, 18sec	(50サイクル)
↓	
T <sub>m</sub> 解析 (1°C/sec)	

各プローブを用いてPCRおよびT<sub>m</sub>解析を行った結果、プローブ3T-mt-R2-18、3T-mt-R2-17、3FL-mt-R2-18および3FL-mt-R2-17を用いたときのみ、T<sub>m</sub>解析で解析の可能な蛍光強度の変化が認められた。なお、各プローブのmt3243変異を含む塩基配列に対する配置を図4および5に示す。図中、Wild配列およびMutant配列は、それぞれ配列番号1および2の塩基配列の塩基番号214～263である。また、図中、Fは蛍光色素を示す。図4および5に示す配置からみて、プローブがT<sub>m</sub>解析で使

用できるかどうかは、蛍光色素を結合させたCの位置に依存すると考えられ、プローブの長さは、多型部位を含む限り、あまり重要でないと考えられる。

サンプルとして、種々の比率で、変異型配列を有するプラスミドと正常型配列を有するプラスミドを含むサンプルとの混合物を調製し、プローブ3FL-mt-R2-17を用いて定量を行った。結果を図6に示す。変異型配列の比率にかかわらず、変異型配列(mutant)と正常型配列(wild)が明確に区別して検出できた。

プローブとして、プローブ3T-mt-R2-18、3T-mt-R2-17および3FL-mt-R2-18を用いた場合も同様の結果が得られた。

なお、図6において縦軸は、蛍光強度の一次導関数の逆符号の値 ( $-dF/dt$ )、横軸は温度 (°C) である。

#### 産業上の利用の可能性

本発明によれば、ミトコンドリアDNA3243変異を検出および定量する方法ならびにそのためのキットが提供される。

また、本発明によれば、mt3243変異を検出するのに有効な消光プローブが提供され、さらに、それを用いるmt3243変異を検出する方法およびそのためのキットが提供される。T<sub>m</sub>解析は数十秒で完了するため、検出に必要な時間が大幅に短縮出来る。プローブの存在下での核酸の増幅とT<sub>m</sub>解析を組み合わせる本発明の好ましい態様によれば、核酸の増幅後にプローブのT<sub>m</sub>を解析するだけなので、反応終了後増幅産物を取り扱う必要がない。よって、増幅産物による汚染の心配がない。また、さらに、増幅に必要な機器と同じ機器で検出することが可能なので、容器を移動する必要すらない。よって、自動化も容易である。



## 請求の範囲

1. 試料から得られるDNAを鋳型として用いてPCRを行い、増幅産物を検出することを含む、ミトコンドリアDNA3243変異を有するDNAの検出方法であって、PCRで用いられるプライマーは、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12～30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含む検出方法。

2. PCRで用いられるプライマーが、配列番号3に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号5に示す塩基配列を示すプライマーを含む請求項1に記載の方法。

3. 試料から得られるDNAを鋳型として用いて定量的PCRを行い、増幅産物を定量することを含む、ミトコンドリアDNA3243変異を有するDNAの定量方法であって、定量的PCRは、増幅産物の量に依存して蛍光が変化する系を用いて、蛍光の測定によりPCRにおける増幅産物の定量をリアルタイムに行い、その結果に基づいてサンプル中のDNAを定量する方法であり、定量的PCRで用いられるプライマーは、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12～30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含む定量方法。

4. 定量的PCRで用いられるプライマーが、配列番号3に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号5に示す塩基配列を示すプライマーからなる請求項3に記載の方法。

5. (a) 請求項3または4に記載の方法により、ミトコンドリアDNA3243変異を有するDNAを定量し、

(b) 試料から得られるDNAを鋳型として用いて定量的PCRを行い、増幅産物を定量することを含む、ミトコンドリアDNAの定量方法であって、定量的PCRは、増幅産物の量に依存して蛍光が変化する系を用いて、蛍光の測定によりPCRにおける増幅産物の定量をリアルタイムに行い、その結果に基づいてサンプル中のDNAを定量する方法により、ミトコンドリアDNAを定量し、

(c) (a) と (b) の結果から、ミトコンドリアDNA3243変異のヘテロプラスミーの比率を算出する

ことを含む、試料に含まれるミトコンドリアDNA3243変異のヘテロプラスミ

一の比率の測定方法。

6. (b) の工程で用いられるプライマーペアが、配列番号 3 に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号 4 に示す塩基配列を示すプライマーからなる請求項 5 に記載の方法。

7. 系が、5' 末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号 1 に示す塩基配列において塩基番号 212 もしくは 215 から始まる 15～40 塩基長の塩基配列または配列番号 2 に示す塩基配列において塩基番号 222 から始まる 15～40 塩基長の塩基配列を有する核酸プローブを含み、前記蛍光色素の蛍光が測定される請求項 3～6 のいずれか一項に記載の方法。

8. 請求項 1 記載の検出方法のためのキットであって、配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 243 から始まる 12～30 塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含む前記キット。

9. 配列番号 3 に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号 5 に示す塩基配列を示すプライマーを含む請求項 8 に記載のキット。

10. 請求項 3 記載の方法のためのキットであって、配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 243 から始まる 12～30 塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含む前記キット。

11. 配列番号 3 に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号 5 に示す塩基配列を示すプライマーを含む請求項 10 に記載のキット。

12. 請求項 5 記載の方法のためのキットであって、配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 243 から始まる 12～30 塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含む第 1 のプライマーペア、および、ミトコンドリア DNA 定量用の第 2 のプライマーペアを含む前記キット。

13. 第 1 のプライマーペアが、配列番号 3 に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号 5 に示す塩基配列を示すプライマーからなる請求項 12 に記載のキット。

14. 第 2 のプライマーペアが、配列番号 3 に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号 4 に示す塩基配列を示すプライマーからなる請求項 12 に記

載のキット。

15. 5'末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号1に示す塩基配列において塩基番号212もしくは215から始まる15～40塩基長の塩基配列または配列番号2に示す塩基配列において塩基番号222から始まる15～40塩基長の塩基配列を有する核酸プローブをさらに含む請求項10～14のいずれか一項に記載のキット。

16. 末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号2に示す塩基配列において塩基番号230から始まる14～40塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有し、3'末端が蛍光色素で標識されている前記核酸プローブ。

17. 核酸プローブが、配列番号21または22に示す塩基配列を有する請求項16記載の核酸プローブ。

18. 一塩基多型の部位を有する核酸について、蛍光色素で標識された核酸プローブを用いて、蛍光色素の蛍光を測定することにより融解曲線分析を行い、融解曲線分析の結果に基づいて変異を検出する方法であって、一塩基多型は、ミトコンドリアDNAにおける3243位の変異であり、核酸プローブは、請求項16または17に記載の核酸プローブである前記方法。

19. 試料に含まれる核酸における一塩基多型の部位を含む領域を増幅して一塩基多型を有する核酸を得ることを含む請求項18記載の方法。

20. 増幅をDNAポリメラーゼを用いる方法により行う請求項19記載の方法。

21. 増幅を核酸プローブの存在下で行う請求項20記載の方法。

22. 末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号2に示す塩基配列において塩基番号230から始まる14～40塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有し、3'末端が蛍光色素で標識されている前記核酸プローブを含む、請求項18記載の方法のためのキット。

23. 核酸プローブが、配列番号21または22に示す塩基配列を有する請

求項 2 2 記載のキット。

2 4. ミトコンドリアDNAにおける3243位の変異を含む領域を、DNAポリメラーゼを用いる方法で増幅するためのプライマーをさらに含む請求項 2 2 または 2 3 記載のキット。

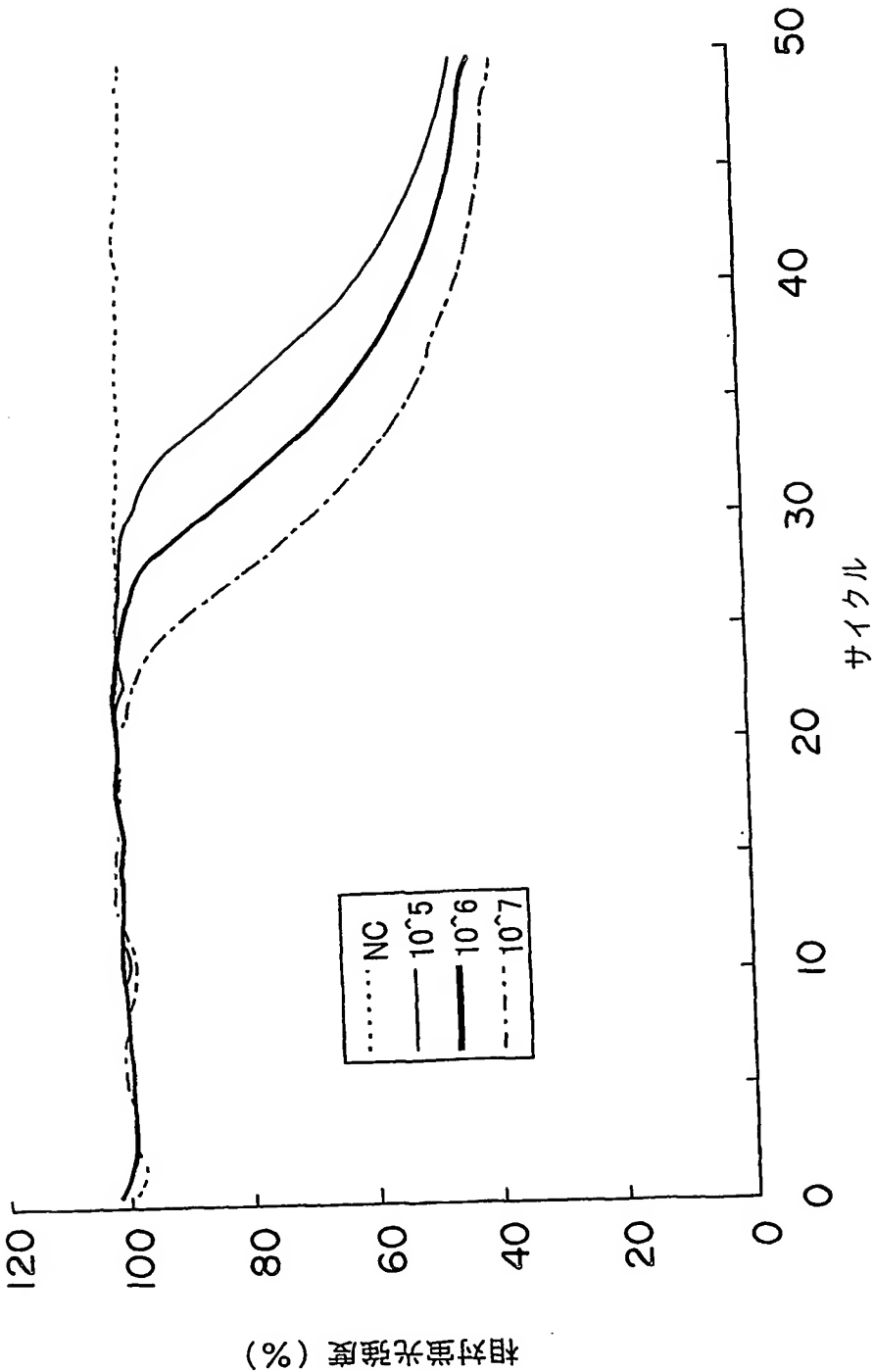


FIG. 1

2 / 6

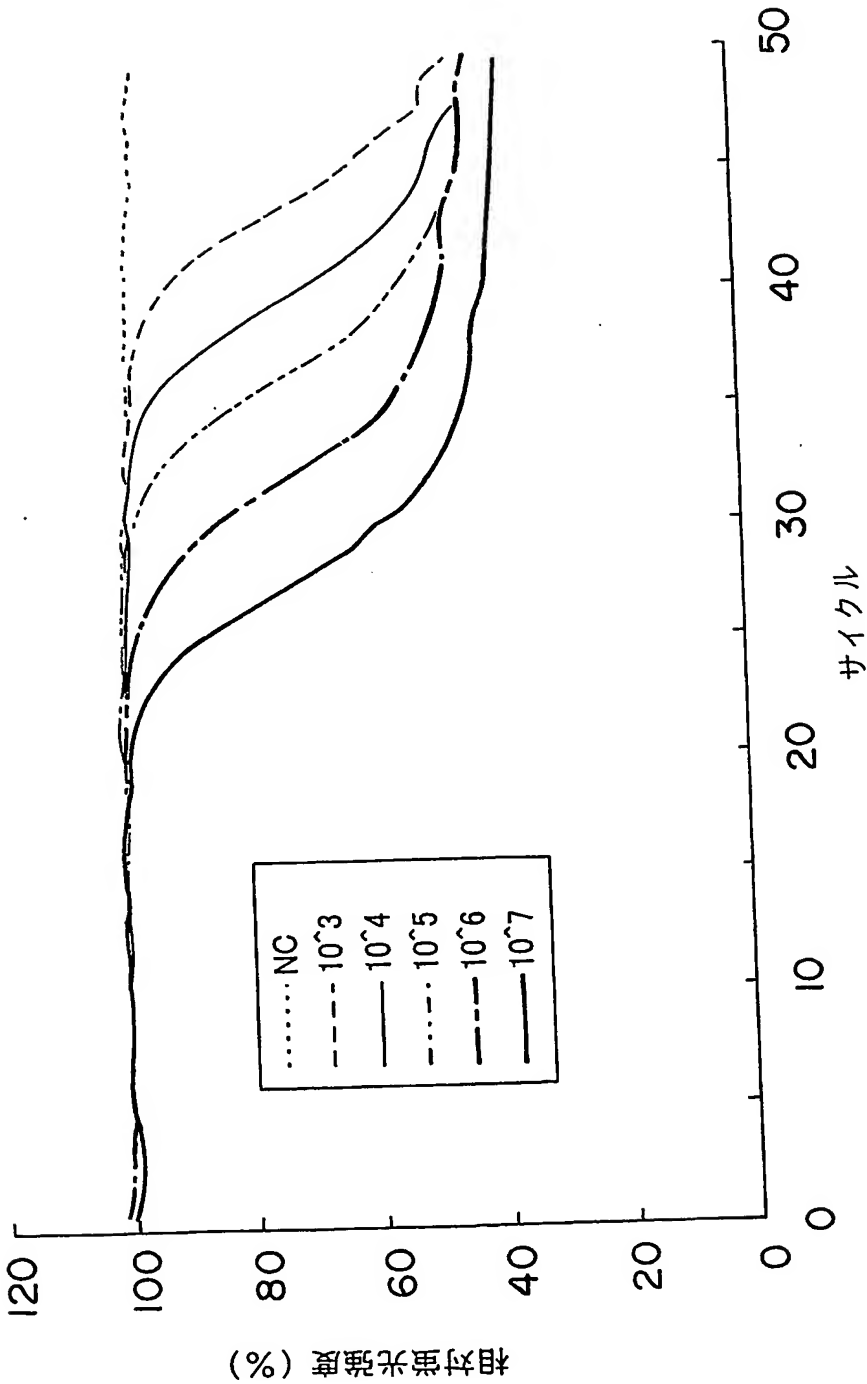


FIG. 2

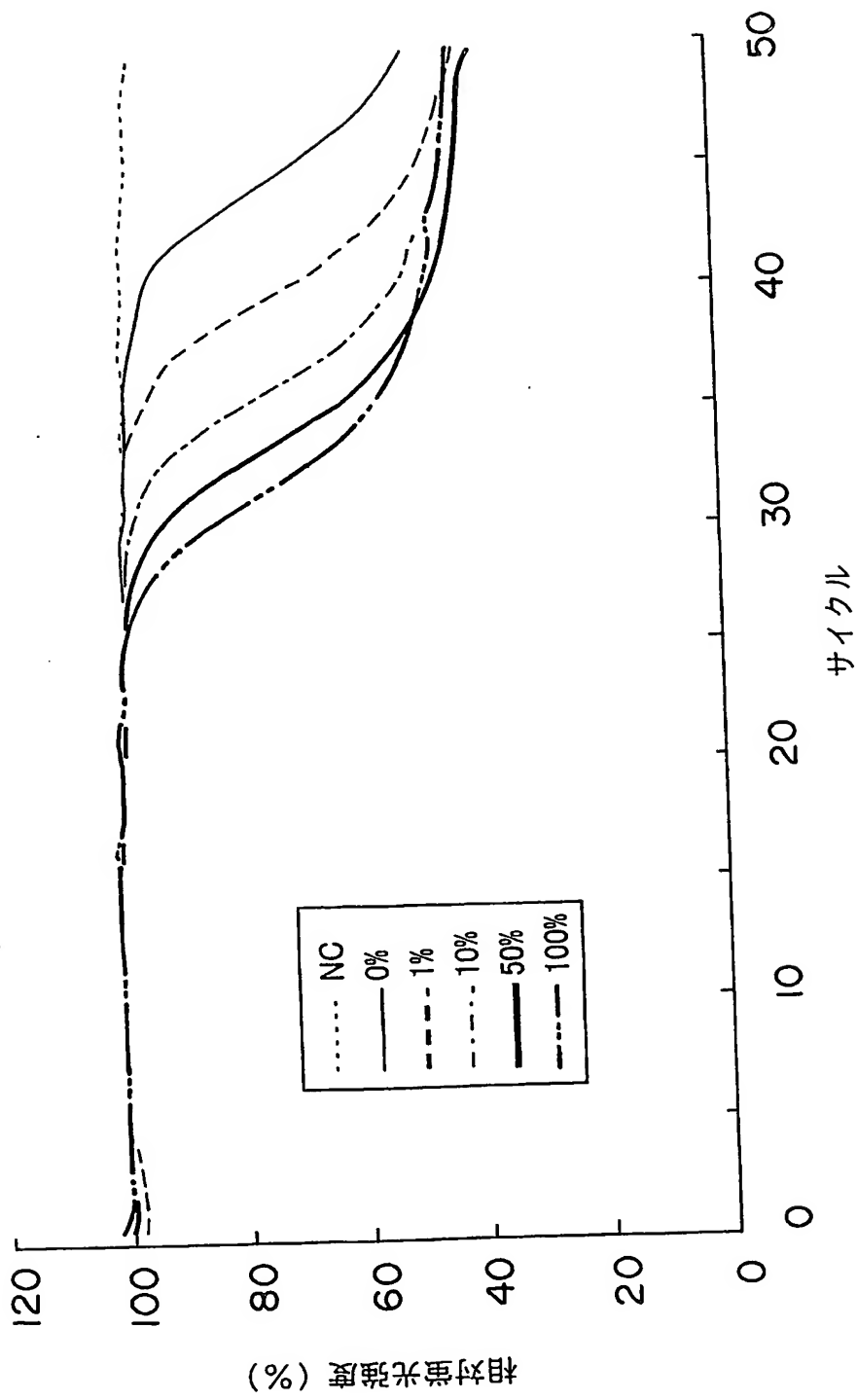


FIG. 3

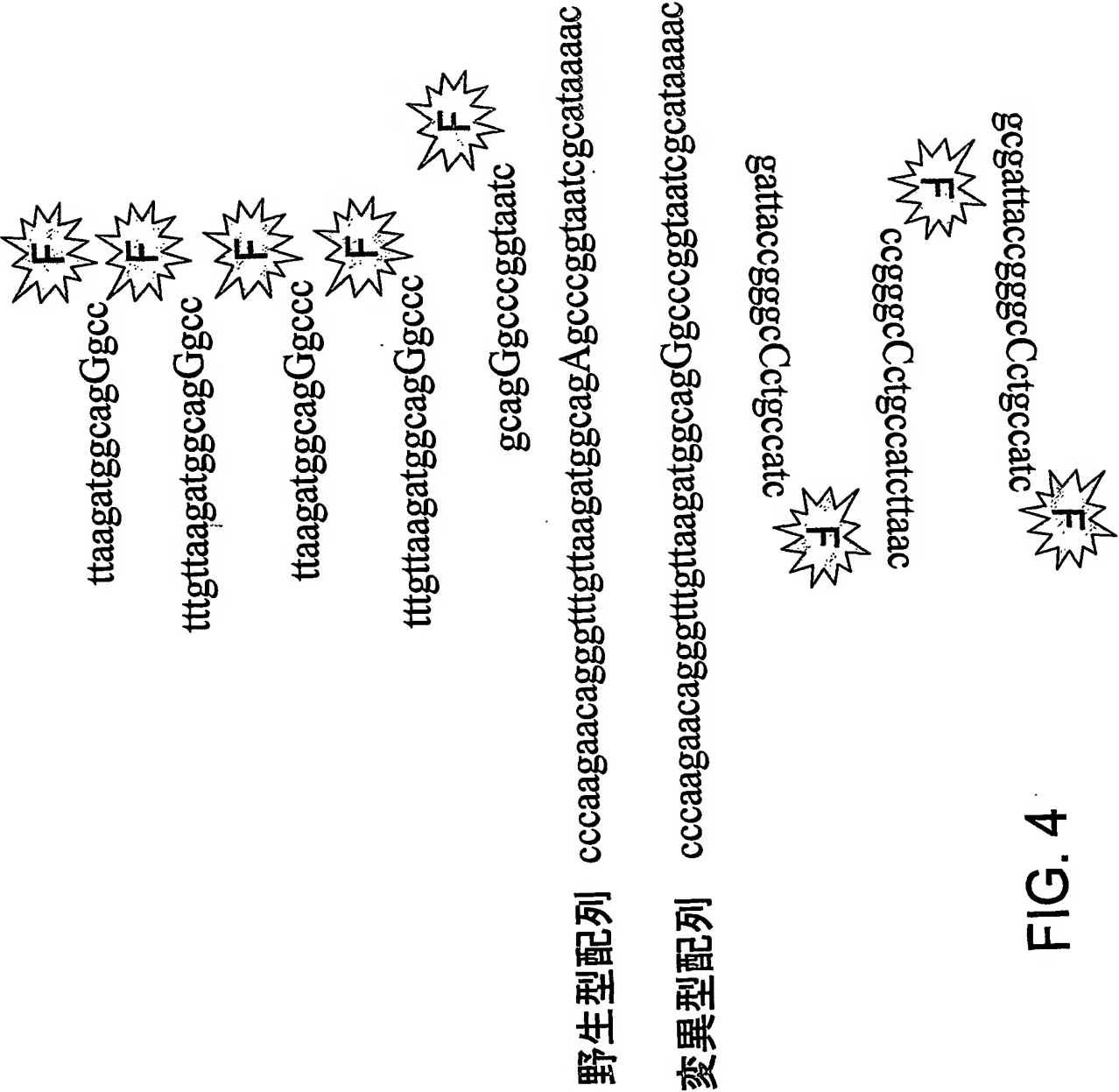


FIG. 4



5/6

野生型配列    cccaagaacagggttggttaagatggcagAgccccgggtaatcgcataaaac

変異型配列    cccaagaacagggttggttaagatggcagGccccgggtaatcgcataaaac

ggggCctgccatctaac



ggcCctgccatctaac



FIG. 5

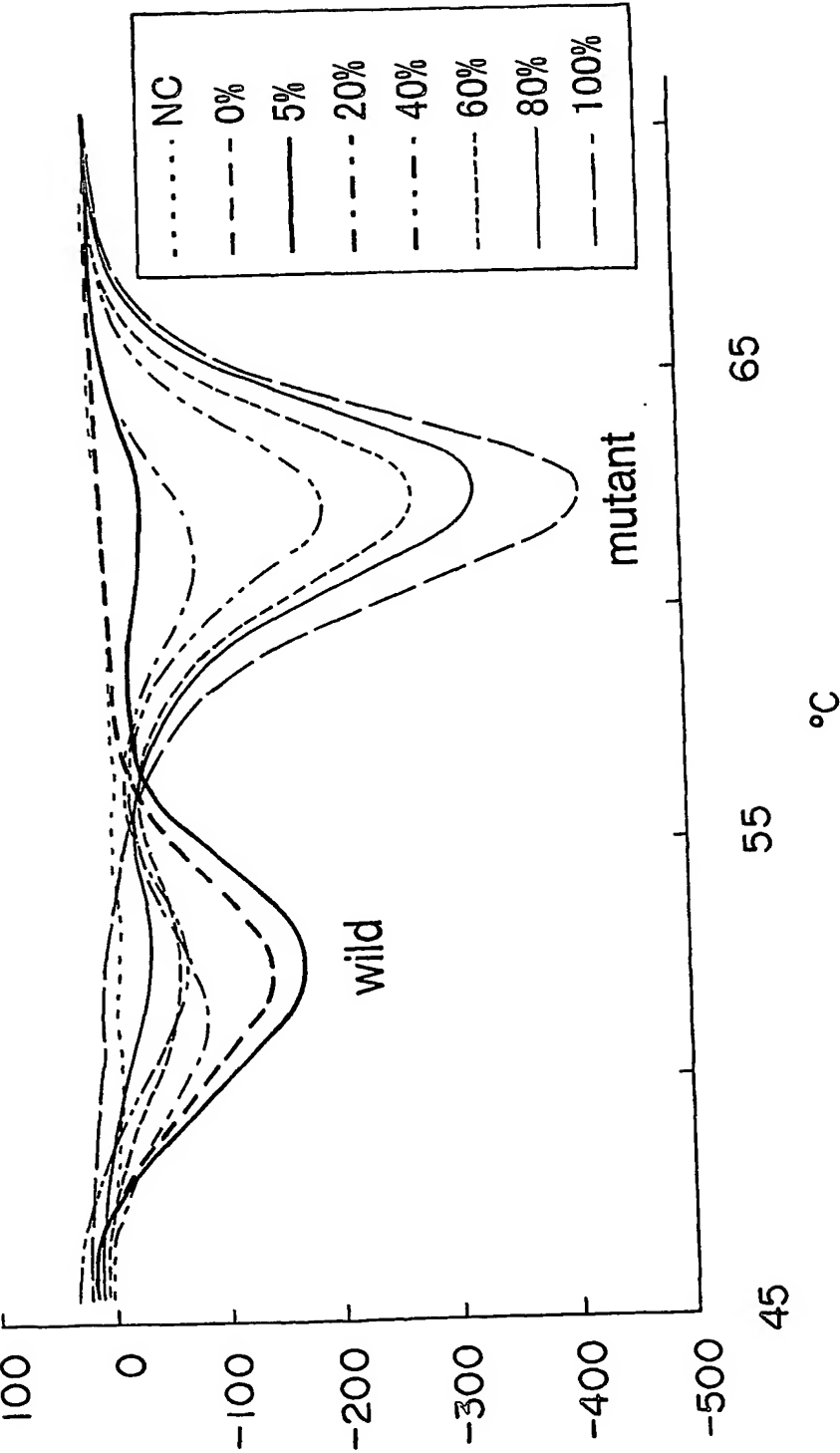


FIG. 6

1/7

## Sequence Listing

&lt;110&gt; アークレイ株式会社 (Arkray, Inc.)

&lt;120&gt; ミトコンドリアDNA 3 2 4 3 変異の検出法および定量法ならびにそのためのキット

&lt;130&gt; G873-OPC4052

&lt;150&gt; JP 2003-111173

&lt;151&gt; 2003-04-16

&lt;150&gt; JP 2003-114382

&lt;151&gt; 2003-04-18

&lt;160&gt; 22

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 500

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; allele

&lt;222&gt; 243

&lt;400&gt; 1

ggacatcccg atggtgcagc cgctattaaa ggttcgtttg ttcaacgatt aaagtcctac	60
gtgatctgag ttcagaccgg agtaatccag gtcggtttct atctaccttc aaattcctcc	120
ctgtacgaaa ggacaagaga aataaggcct acttcacaaa gcgccttccc ccgtaaataga	180
tatcatctca acttagtatt ataccacac ccaccaaga acagggtttg ttaagatggc	240
agagcccggt aatcgcataa aacttaaaac ttacagtca gaggttcaat tcctcttctt	300
aacaacatac ccatggccaa cctcctactc ctcatgttac ccattctaat cgcaatggca	360
ttcctaatagc ttaccgaacg aaaaattcta ggctatatac aactacgcaa aggccccaac	420
gtggtaggcc cctacgggct actacaacc ttcgctgacg ccataaaact cttcaccaaa	480
gagcccctaa aaccgcccac	500

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 500

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

2/7

&lt;221&gt; allele

&lt;222&gt; 243

&lt;400&gt; 2

```

ggacatcccg atggtgcagc cgctattaaa ggttcgtttg ttcaacgatt aaagtcctac      60
gtgatctgag ttcagaccgg agtaatccag gtcggtttct atctaccttc aaattcctcc      120
ctgtacgaaa ggacaagaga aataaggcct acttcacaaa gcgccttccc ccgtaaatga      180
tatcatctca acttagtatt ataccacac ccaccaaga acagggtttg ttaagatggc      240
agggcccggg aatcgcataa aacttaaaac tttacagtca gaggttcaat tcctcttctt      300
aacaacatac ccatggccaa cctcctactc ctcatgttac ccattctaata cgcaatggca      360
ttcctaatagc ttaccgaacg aaaaattcta ggctatatac aactacgcaa aggcccacac      420
gtggtaggcc cctacgggct actacaaccc ttcgctgacg ccataaaact cttcaccaaa      480
gagcccctaa aaccggccac                                     500

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt; 3

```

ctcaacttag tattataccc acac                                     24

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt; 4

```

ttttatgcga ttaccgggc                                     19

```

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

3/7

<400> 5  
atgcgattac cgggcc 16

<210> 6  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> probe

<400> 6  
cagggtttgt taagatggca ggg 23

<210> 7  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> probe

<400> 7  
ccaagaacag ggtttgtaa gatg 24

<210> 8  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> probe

<400> 8  
ccaagaacag ggtttgtaa gatggc 26

<210> 9  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

4/7

&lt;223&gt; probe

&lt;400&gt; 9

ccaagaacag ggtttgtaa gatggcag

28

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; probe

&lt;400&gt; 10

cacccaagaa cagggtttgt taagatggca

30

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt; 11

catctcaact tagtattata cccacac

27

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt; 12

agaggaattg aacctctgac tg

22

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

5/7

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; probe

&lt;400&gt; 13

tttgttaaga tggcagggcc

20

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; probe

&lt;400&gt; 14

tttgttaaga tggcagggcc c

21

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; probe

&lt;400&gt; 15

gcgattaccg ggccctgcca tc

22

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; probe

&lt;400&gt; 16

ccgggccctg ccatcttaac

20

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; DNA

6/7

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; probe

&lt;400&gt; 17

ttaagatggc agggccc

17

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; probe

&lt;400&gt; 18

ttaagatggc agggcc

16

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; probe

&lt;400&gt; 19

gattaccggg ccctgccatc

20

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; probe

&lt;400&gt; 20

gcagggcccg gtaatc

16

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 18



7/7

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; probe

&lt;400&gt; 21

gggccctgcc atcttaac

18

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; probe

&lt;400&gt; 22

ggccctgcca tcttaac

17

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005496

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/68, C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/00-70, C12N15/00-90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JICST FILE (JOIS), EUROPAT (QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	P. SEIBEL et al., A Rapid and Sensitive PCR Screening Method for Point Mutations Associated with Mitochondrial Encephalomyopathies, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1994, 200(2), p.938-42	1, 2, 8, 9 3-7, 10-24
X Y	M. ODAWARA et al., Selection of primers for detection of A to G mutation at nucleotide 3243 of the mitochondrial gene, Diabetologia, 1995, 38(3), p.377-8	1, 2, 8, 9 3-7, 10-24
X Y	C. ZHANG et al., Occurrence of a Particular Base Substitution (3243 A to G) in Mitochondrial DNA of Tissues of Ageing Humans, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993, 195(2), p1104-10	2, 9 3-7, 10-24

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
02 July, 2004 (02.07.04)

Date of mailing of the international search report  
20 July, 2004 (20.07.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005496

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2002-119291 A (Japan Bioindustry Association), 23 April, 2002 (23.04.02), & WO 2002/008414 A1 & EP 1295941 A1 & US 2002/0106653 A1	3-7, 10-24
Y	K. TSUKUDA et al., Screening of Patients with Maternally Transmitted Diabetes for Mitochondrial Gene Mutations in the tRNA <sup>Leu(UUR)</sup> Region, Diabetic Medicine, 1997, 14, p.1032-7	16-24
A	J. LOEFFLER et al., Rapid Detection of Point Mutations by Fluorescence Resonance Energy Transfer and Probe Melting Curves in Candida Species, Clinical Chemistry, 2000, 46 (5), p. 631-5	1-24
A	Michizo NAKAMURA et al., "Hen'i Mitochondria DNA no Kenshutsuho no Shinpo mutation-specific PCR ni yoru mit DNA Ten Hen'i Kenshutsuho", 1997, 55 (12), p.3277-81	1-24
A	JP 11-221077 A (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), 17 August; 1999 (17.08.99), (Family: none)	1-24

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/005496

**Box No. II****Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: (see below)  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
Some of claims 1-4 and 6-24 either fail to clearly define the scope of claims or are not fully supported by the description and are not clearly and fully disclosed in the description, so that any international search has been carried out. For the reason, see extra sheet.
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III****Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1-15 are common to claims 16-24 in the technical matter of a method of detecting mitochondrial DNA 3243 variation. However, this common matter is publicly known as described in, for example, the following reference. Consequently, it cannot be stated that the claims 1-15 and the claims 16-24 share special technical features. Therefore, these claimed inventions do not constitute a group of inventions linked so as to form a single general inventive concept.

(Continued to extra sheet.)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005496

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

G.S.P. YU et al., "Keiko Bio Image Analyzer (FM-BIO) ni yoru Mitochondria Idenshi 3243 Hen'I no Kenshutsu", The Japanese Journal of Clinical Pathology, 1996, 44(8), p.778-82

Claims 1, 3, 8, 10 and 12

With respect to the invention of these claims, taking into account that the base sequence of SEQ ID No. 1 is derived from wild type, a DNA having mitochondrial DNA 3243 variation cannot be detected by the use of a primer having a base sequence complementary for the above base sequence. Therefore, the invention of these claims cannot be stated as being fully supported by the description and are not clearly and fully disclosed to such an extent that an expert in the art to which the invention pertains can carry out the invention.

Incidentally, search has been conducted interpreting the primer according to the invention of these claims as a primer composed of a base sequence complementary for the base sequence of SEQ ID No. 2 derived from variant type, for example, a primer composed of the base sequence of SEQ ID No. 5.

Claims 1-4, 6-17, 22 and 23

With respect to the description "having a base sequence" used in these claims, whether or not "composed of a base sequence" is meant, "including a base sequence" is meant or anything else is meant thereby is ambiguous. Thus, these claims cannot be stated as being clearly drafted.

Likewise, in these claims, the wordings of "having a base sequence" and "exhibiting a base sequence" are not clear.

With respect to the above ambiguous wordings, search has been conducted by interpreting them as meaning "composed of a base sequence" or "composed of a base sequence and".

Claims 16-24

Taking Examples, etc. into account, a nucleic acid probe capable of detecting a DNA having mitochondrial DNA 3243 variation is only a nucleic acid probe composed of a base sequence of SEQ ID No. 21 or 22. Except for this nucleic acid probe, what structure is had by the nucleic acid probe composed of "a base sequence complementary for a base sequence of 14 to 40 base length starting from base No. 230 in the base sequence of SEQ ID No. 2" usable in the detection is ambiguous. Therefore, the invention of these claims cannot be stated as being fully supported by the description and are not clearly and fully disclosed to such an extent that an expert in the art to which the invention pertains can carry out the invention.

No search has been conducted on the inventions other than the invention relating to the nucleic acid probe composed of a base sequence of SEQ ID No. 21 or 22, which are not fully supported by the description and are not clearly and fully disclosed in the description.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12Q 1/68, C12N 15/09

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12Q 1/00-70, C12N 15/00-90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS), EUROPAT(QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	P. SEIBEL, et. al, A Rapid and Sensitive PCR Screening Method for Point Mutations Associated with Mitochondrial Encephalomyopathies, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1994, 200 (2), p.938-42	1, 2, 8, 9 3-7, 10-24
X Y	M. ODAWARA, et. al, Selection of primers for detection of A to G mutation at nucleotide 3243 of the mitochondrial gene, Diabetologia, 1995, 38 (3), p.377-8	1, 2, 8, 9 3-7, 10-24

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02. 07. 2004

国際調査報告の発送日

20. 7. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

阪野 誠司

4N

9286

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	C. ZHANG, et. al, Occurrence of a Particular Base Substitution (3243 A to G) in Mitochondrial DNA of Tissues of Ageing Humans, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993, 195 (2), p.1104-10	2, 9 3-7, 10-24
Y	JP 2002-119291 A (財団法人バイオインダストリー協会) 2002. 04. 23 & WO 2002/008414 A1 & EP 1295941 A1 & US 2002/0106653 A1	3-7, 10-24
Y	K. TSUKUDA, et. al, Screening of Patients with Maternally Transmitted Diabetes for Mitochondrial Gene Mutations in the tRNA <sup>Leu(UUR)</sup> Region, Diabetic Medicine, 1997, 14, p.1032-7	16-24
A	J. LOEFFLER, et. al, Rapid Detection of Point Mutations by Fluorescence Resonance Energy Transfer and Probe Melting Curves in Candida Species, Clinical Chemistry, 2000, 46 (5), p.631-5	1-24
A	中村道三 他, 変異ミトコンドリアDNAの検出法の進歩 mutation-specific PCRによるmit DNA点変異検出法, 1997, 55 (12), p.3277-81	1-24
A	JP 11-221077 A (大塚製薬株式会社) 1999. 08. 17 (ファミリーなし)	1-24

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲（下記参照） \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
請求の範囲1-4, 6-24の一部は、請求の範囲が明確に記載されていないか、または、明細書に十分に裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていないため、国際調査を行っていない。理由は、特別ページを参照。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-15及び請求の範囲16-24は、ミトコンドリアDNA3243変異を検出する方法を共通の技術的事項とするが、この共通事項については、例えば、以下の文献に示されているように公知である。よって、請求の範囲1-15及び請求の範囲16-24は、特別な技術的特徴を共有するものとはいえないから、これらの発明群は、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえない。

G. S. P. YU, et. al, 蛍光バイオイメージアナライザー（FM-BIO）によるミトコンドリア遺伝子3243変異の検出,  
臨床病理, 1996, 44 (8), p. 778-82

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



## 請求の範囲 1、3、8、10、12

上記請求の範囲に係る発明において、配列番号 1 に示す塩基配列は野生型由来であることを考えれば、該塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを用いることでは、ミトコンドリア DNA 3243 変異を有する DNA を検出することができない。したがって、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されていない。

なお、上記請求の範囲に係る発明におけるプライマーは、変異型由来の配列番号 2 に係る塩基配列に相補的な塩基配列からなるプライマー、例えば、配列番号 5 に示す塩基配列からなるプライマーと解して調査を行った。

## 請求の範囲 1-4、6-17、22、23

上記請求の範囲における「塩基配列を有する」という記載は、「塩基配列からなる」ことを意味するのか、「塩基配列を含む」ことを意味するのか、或いは、別のことを意味するのか不明であり、上記請求の範囲は、明確に記載されているとはいえない。

同様に、上記請求の範囲における「塩基配列を有し」、「塩基配列を示す」という記載は明確でない。

なお、上記不明確な記載は、「塩基配列からなる」または「塩基配列からなり」を意味すると解して調査を行った。

## 請求の範囲 16-24

実施例等を見ても、ミトコンドリア DNA 3243 変異を有する DNA を検出できる核酸プローブは、配列番号 21 または 22 に示す塩基配列からなる核酸プローブのみであり、これら以外に、検出に用いることのできる「配列番号 2 に示す塩基配列において塩基番号 230 から始まる 14~40 塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列」からなる核酸プローブがどのような構造を有しているか不明である。したがって、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されていない。

なお、明細書に十分に裏付けられておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない配列番号 21 または 22 に示す塩基配列からなる核酸プローブに係る発明以外の発明については、調査を行っていない。